

FR 2440376

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002518771

WPI Acc No: 1980-36799C/198021

Related WPI Acc No: 1981-29440D; 1981-75714D; 1982-97811E; 1985-305015

Anticoagulant heparin mucopolysaccharide fraction - with improved specificity produced by alcohol fractionation of heparin

Patent Assignee: CHOAY SA (LCHO); SANOFI SA (SNFI)

Inventor: CHOAY J; GOULAY J; LORMEAU J C; PETITOU M

Number of Countries: 008 Number of Patents: 017

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 2944792	A	19800514	DE 2944792	A	19791106	198021 B
GB 2035349	A	19800618				198025
SE 7909087	A	19800609				198026
JP 55069601	A	19800526				198028
FR 2440376	A	19800704				198033
FR 2461719	A	19810313				198118
GB 2035349	B	19830511				198319
US 4486420	A	19841203				198451
US 4500519	A	19850219				198510
SE 449753	B	19870518				198722
IT 1126319	B	19860521				198738
US 4692435	A	19870908	US 7991164	A	19791105	198738
			US 80204505	A	19801105	
US 4804652	A	19890214	US 7991164	A	19791105	198909
			US 80204505	A	19801106	
JP 91023528	B	19910329				199117
JP 3243601	A	19911030				199150
MX 183984	B	19970210	MX 912868	A	19911230	199818
US 35770	E	19980414	US 7991164	A	19791105	199822
			US 80194545	A	19801006	
			US 95574761	A	19951219	

Priority Applications (No Type Date): FR 7918873 A 19790720; FR 7831357 A 19781106; FR 806282 A 19800320; GB 7934673 A 19791005; GB 80443 A 19800107; GB 8021749 A 19800702; GB 8021750 A 19800702; GB 8029697 A 19800915

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
US 4692435	A			Cont of application US 7991164
US 4804652	A			Cont of application US 80204505
US 35770	E	18	A61K-031/725	Cont of application US 7991164
MX 183984	B		A61K-031/725	CIP of application US 80204505
				CIP of application US 7991164
				Reissue of patent US 4401662

Abstract (Basic): DE 2944792 A

New mucopolysaccharide fraction obtainable from fractions contg. heparin or heparin components with molecular weights of 2000-50000 is soluble in an az.-ethanolic medium with a titre of 55-61 degrees GL;

tends to insolubility in an aq-ethanolic medium with higher alcohol content; is insol. in pure alcohol; and has a ratio of Yin-Nessler titre to USP titre of is not <2 (pref. is not <3, esp. >=6).

The new fraction has an anticoagulant effect, but it is more selective than heparin in that it acts on a smaller number of coagulation factors (esp. activated factor X), so the risk of hypercoagulability is reduced and the need for patient monitoring is minimised.

Title Terms: ANTICOAGULANT; HEPARIN; MUCO; POLYSACCHARIDE; FRACTION; IMPROVE; SPECIFIC; PRODUCE; ALCOHOL; FRACTIONATE; HEPARIN

Derwent Class: A96; B04; S03

International Patent Class (Main): A61K-031/725

International Patent Class (Additional): A61K-031/72; C08B-037/010;
C08B-037/10

File Segment: CPI; EPI

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 440 376

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 78 31357

(54) Composition mucopolysaccharidique ayant une activité régulatrice de la coagulation,
médicament la contenant et procédé pour l'obtenir.

(51) Classification internationale. (Int. Cl 3) C 08 B 37/10; A 61 K 31/725; G 01 N 33/16.

(22) Date de dépôt 6 novembre 1978, à 15 h 35 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 22 du 30-5-1980.

(71) Déposant : CHOAY S.A. Société anonyme, résidant en France.

(72) Invention de : Jean-Claude Lormeau, Jean Goulay et Jean Choay.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud.

L'invention est relative à une fraction mucopolysaccharidique douée de propriétés biologiques, lui permettant notamment de jouer un rôle régulateur vis-à-vis de la coagulation sanguine. Une telle fraction peut notamment être obtenue à partir de préparations d'héparine, telles qu'extraites de tissus de mammifères.

On sait que l'héparine est sans doute à ce jour l'un des plus importants médicaments anticoagulants - sinon le plus important - dont dispose le clinicien. Elle est en effet capable d'intervenir à plusieurs niveaux dans les cascades de réactions enzymatiques successives, qui sont normalement mises en jeu au cours de l'hémostase physiologique, dans toute situation susceptible d'entrainer une hypercoagulabilité du sang. Elle est plus particulièrement capable de déprimer simultanément un grand nombre des facteurs de la coagulation intervenant dans la création et le maintien des différentes formes d'hypercoagulabilité.

On rappellera ci-après, dans les limites de ce qui est nécessaire pour la clarté de l'exposé, quelquesunes des notions de base, et volontairement simplifiées, relatives à la coagulation. Le processus de coagulation comprend en effet trois phases généralement décrites comme successives, même si elles sont étroitement intriquées :

- la thromboplastinoformation, phase de formation de prothrombinase (ou thromboplastine active),
- la thrombinoformation, phase qui peut se résumer à la transformation de la prothrombine en thrombine sous l'influence de la prothrombinase en présence de calcium ionisé et enfin
- la fibrinoformation, phase au cours de laquelle le fibrogène sanguin est, sous l'effet de la thrombine, transformé en fibrine, protéine qui tend à devenir insoluble.

La formation de prothrombinase se fait, au cours de l'étape de thromboplastinoformation essentiellement selon deux voies différentes : la voie intrinsèque ou endogène, et la voie extrinsèque ou exogène, lesquelles aboutissent à la formation de prothrombinases d'origines respectivement plasmatique et tissulaire, toutes deux susceptibles d'activer la prothrombine en thrombine active.

La voie (ou système) intrinsèque ou endogène fait intervenir un grand nombre de facteurs ou proenzymes plasmatiques susceptibles d'être successivement activés (facteurs XIII, XI, IX, VIII et X), où chaque produit activé (facteurs XIIa, XIa, IXa, VIIIa et Xa) agit comme une enzyme capable d'activer la pro-

enzyme suivante, le facteur X activé (Xa) intervenant alors, notamment par réaction avec le facteur V et un phospholipide d'origine plaquettaire, dans la production de prothrombinase plasmatische endogène active. Le système extrinsèque ou exogène, qui peut notamment se trouver sous la dépendance directe d'une lésion tissulaire, fait appel à un nombre plus limité de facteurs et comporte notamment la production de thromboplastine tissulaire qui, en combinaison avec le facteur VII, peut, tout comme le facteur VIIIa, transformer le facteur X inactif en facteur Xa. La séquence d'activation de la prothrombine en thrombine est ensuite sensiblement la même que pour le système intrinsèque, mais le phospholipide est ici d'origine tissulaire et non plasmatische.

On peut donc, à la limite, exprimer l'idée que les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, se rejoignent au niveau de l'activation du facteur X (aussi appelé facteur Stuart), les deux phases suivantes de la coagulation - thrombinoformation et fibrinof ormation - ne donnant alors plus lieu à une distinction entre voies intrinsèque et extrinsèque.

L'aboutissement du processus de coagulation consiste dans la formation d'un caillot de fibrine insoluble, destiné notamment à colmater la lésion à l'origine du déclenchement de ce processus, par exemple au niveau d'un vaisseau sanguin.

Ces processus de coagulation font normalement place ensuite à un processus, dénommé fibrinolyse, destiné à produire la lyse du caillot, notamment sous l'effet de la plasmine, enzyme qui n'existe normalement dans le sang circulant que sous la forme d'un précurseur inactif, le plasminogène, la fibrine elle-même constituant néanmoins l'un des facteurs susceptibles de déclencher la transformation du plasminogène inactif en plasmine fibrinolytiquement active.

En fait, bien que l'on ait, dans ce qui précède, présenté les systèmes de coagulation et de fibrinolyse comme deux processus se produisant successivement dans le temps, il n'en est pas normalement toujours ainsi dans la réalité. En fait, il s'agit de mécanismes équilibrés, selon des processus extrêmement complexes, sous la dépendance de facteurs activateurs et inhibiteurs harmonieusement opposés. Le déséquilibrage de ces mécanismes, dans le sens d'une hypercoagulabilité, est alors susceptible d'entrainer des thromboses. A l'opposé, un déséquilibre dans le sens d'une hypocoagulabilité, expose l'hôte à des risques hémorragiques.

C'est évidemment pour pallier les effets d'hypercoagulabilité que l'on a couramment recours aux puissantes propriétés anticoagulantes de l'héparine, en vue de ramener le mécanisme coagulation-fibrinolyse à l'équilibre, chaque fois que celui-ci 5 subit une perturbation importante, par exemple à l'occasion d'une intervention chirurgicale sur l'hôte. Il est cependant bien connu que ces tentatives de rééquilibrage sont extrêmement délicates et que, en conséquence, l'administration de doses trop 10 élevées de médicament anticoagulant - ou l'insuffisante sélectivité de celui-ci - dans le but de prévenir les risques d'hypercoagulation, par exemple l'apparition de thromboses post-chirurgicales, peut finalement être à l'origine d'hémorragies graves : d'où la nécessité d'une surveillance constante des patients traités et des ajustements nécessaires des doses administrées 15 - en continu ou en discontinu - en fonction des résultats de tests, notamment de coagulabilité globale, comme le temps de Howell, qui doivent être pratiqués à intervalles réguliers.

L'invention a donc pour but de fournir des principes actifs de médicaments (et les médicaments eux-mêmes) qui permettent de remédier au moins en partie à ces difficultés, notamment qui soient capables de permettre un rééquilibrage éventuel et/ou un contrôle plus aisés, au prix d'une moindre surveillance clinique du système coagulation-fibrinolyse chez des patients affectés d'une pathologie de la coagulation ou ayant subi un traitement, tel qu'une intervention chirurgicale, qui les exposent 25 à des risques d'hypercoagulabilité.

L'invention concerne plus particulièrement une fraction mucopolysaccharidique exerçant un effet régulateur à l'égard de la coagulation, notamment dans le sens d'un retard à la coagulation, cependant par la mise en jeu d'actions inhibitrices plus sélectives que celles de l'héparine, à l'égard d'un nombre plus réduit de facteurs de coagulation, plus particulièrement à l'égard du facteur X activé .

L'invention est donc relative à une fraction mucopolysaccharidique susceptible d'être obtenue à partir de l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépariniques de poids moléculaires s'étageant notamment d'environ 2.000 à 50.000, tels qu'obtenus par extraction à partir de tissus de mammifères, cette fraction étant caractérisée en ce qu'elle est soluble dans 40 un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de

55-61° GL, en ce qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est insoluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle présente un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement dans 5 un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3, de préférence supérieure à 6.

Ces fractions mucopolysaccharidiques donnent lieu à des fractionnements supplémentaires, permettant l'obtention de 10 fractions mucopolysaccharidiques de haute activité spécifique, au niveau du titre Yin-Wessler et présentant des rapports du titre Yin-Wessler au titre USP dépassant 10, voire 16.

Le titre de Yin-Wessler est mesuré selon la technique de ces auteurs qui est décrite dans "J. Lab. Clin. Med.", 1976, 81, 298-300.

15 De même, le titre USP, qui mesure, de façon en soi connue, une intensité de coagulation globale dans des conditions bien déterminées, est bien connu. Pour mémoire, il a été mis en oeuvre de la façon décrite dans la Pharmacopée des Etats-Unis XIX, pp. 229-230 (voir aussi le Second Supplément USP-NF, p. 62, 20 et le Quatrième Supplément USP-NF, page 90, respectivement intitulés "Drug Substances and Dosage Forms" (substances médicamenteuses et modes de dosage)).

L'invention fournit un principe actif particulièrement intéressant par la capacité qu'il a d'inhiber le facteur Xa de 25 façon qui peut être très sélective, capacité qui contraste avec son activité sur la coagulation globale, laquelle peut être maintenue à un niveau très faible.

Cette fraction mucopolysaccharidique constitue donc 30 un principe actif de médicament anticoagulant particulièrement avantageux, dans la mesure où l'on peut à ce jour admettre que l'inhibition préférentielle d'un facteur activé, intervenant à un stade plus proche de la thrombinoformation, pratiquement en aval et à l'intersection desdites voies intrinsèque et extrinsèque, est susceptible d'assurer une protection contre les risques d'hypercoagulabilité, équivalente à celle procurée par l'héparine couramment utilisée en thérapeutique, sans cependant, en raison de cette sélectivité d'action, entraîner les mêmes risques hémorragiques que ceux de l'héparine classique. Celle-ci est en effet apte à inhiber non seulement le facteur Xa, mais également d'autres facteurs intervenant tant en amont qu'en aval de celui-ci, à d'autres stades des voies de 35 40

coagulation, par exemple le facteur IIIa. On conçoit que le rééquilibrage *in vivo* du système de coagulation et de fibrinolyse, lorsque celui-ci tend à se déséquilibrer sous l'effet d'une cause pathologique ou d'une intervention extérieure, par exemple chirurgicale, soit plus facile à réaliser avec un médicament agissant sélectivement sur un facteur spécifique, le facteur X, plus particulièrement au niveau de l'inhibition du facteur Xa, qu'avec un médicament susceptible d'agir de façon non différenciée sur plusieurs facteurs de coagulation à la fois.

10 L'invention concerne également un procédé pour obtenir une telle fraction mucopolysaccharidique, ce procédé étant caractérisé par :

- la mise en suspension dans un milieu hydro-alcoolique du type eau-éthanol, ayant un titre compris entre environ 55 et environ 15 61° GL, de préférence de l'ordre de 58° GL, d'une matière à base d'héparine ou de constituants hépariniques dont les poids moléculaires s'étagent notamment de 2.000 à 50.000, cette matière ayant une teneur réduite en sels minéraux, de préférence inférieure à 1 % en poids,
- 20 - la séparation de la fraction insoluble et la récupération de la solution contenant la fraction mucopolysaccharidique dissoute, dont elle peut à son tour être séparée, notamment par précipitation alcoolique, à partir du susdit milieu hydro-alcoolique.

La matière première, à partir de laquelle le mucopolysaccharide selon l'invention peut être extrait, peut être constituée par une héparine de qualité pharmaceutique classique, injectable, ou par une héparine brute telle qu'elle est obtenue à l'issue des opérations d'extraction de ce principe actif à partir de tissus ou d'organes de mammifères, notamment de mucus d'intestins ou de poumons, par exemple de porc ou de boeuf. Elle peut encore être constituée par les fractions qui sont normalement écartées (produits de rejet) lors de la purification d'une telle héparine brute, en vue de l'obtention d'une héparine de qualité injectable et d'activité spécifique plus élevée, à condition bien entendu que les produits de rejet de moindre activité spécifique contiennent encore des constituants hépariniques.

35 Il est alors possible, à partir de matières premières de ce type, sensiblement exemptes de protéines, d'acides nucléiques et de sels minéraux, de préférence lorsque des teneurs pon-

dérales de ces derniers sont inférieures à 1 %, d'obtenir par extraction à l'alcool 55-61°GL une fraction mucopolysaccharidique contenant des constituants de faibles poids moléculaires, dont les titres Yin-Wessler et USP sont dans un rapport d'environ 2 à environ 5, notamment de 3 à 5.

5 On peut remarquer qu'en utilisant des mélanges eau-éthanol ayant plus de 61° GL, le rendement d'extraction devient pratiquement nul. Au contraire, l'utilisation de milieux hydro-alcoolique de titre inférieur à 55° GL entraîne la solubilisation de constituants dont la présence conduit à une réduction du rapport des titres Yin-Wessler/USP.

10 Il est à remarquer que l'on peut procéder à des fractionnements supplémentaires de la fraction mucopolysaccharidique obtenue à l'issue du procédé sus-décris, par diverses techniques, telles que gel-filtration ou encore précipitation sélective dans 15 un milieu hydro-alcoolique de titre déterminé, en présence de proportions également déterminées d'un sel minéral, tel que le chlorure de sodium.

20 Un fractionnement supplémentaire peut être obtenu par une étape supplémentaire appliquée à ladite fraction mucopolysaccharidique, préalablement remise en solution dans l'eau, étape qui consiste à ajouter à cette solution aqueuse de 1 à 2 volumes d'éthanol et de 10 à 100 g/l de chlorure de sodium et à recueillir, 25 d'une part, le précipité formé également actif et, d'autre part, le contenu restant dissous dans le surnageant, notamment par une nouvelle précipitation alcoolique, et qui constitue un produit de fractionnement dont les titres Yin-Wessler et USP respectivement sont dans un rapport encore plus élevé que celui relatif à la fraction initiale, notamment passent d'une valeur de 30 l'ordre de 3 à une valeur de l'ordre de 6 à 8.

Des fractions mucopolysaccharidiques ayant un rapport de titres Yin-Wessler/USP plus élevé peuvent aussi être obtenues par gel-filtration à partir des fractions de première extraction par le milieu hydro-alcoolique 55-61°GL, après remise en solution préalable dans un solvant aqueux, telle qu'une solution 35 NaCl 0,5 M ; tris-HCl 0,1 M ; pH 7,5. Une telle solution peut être passée sur un gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, sous la désignation commerciale ULTROGEL AcA 44, dont la zone de fractionnement effectif se situe entre des poids moléculaires effectifs de 4.000 à 60.000 (pour les molécules linéaires).

Des fractions mucopolysaccharidiques de l'invention, qui ont un rapport de titres Yin-Wessler/USP plus élevé, sont celles qui passent après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris (le volume mort étant le volume de liquide que peut contenir la colonne de gel, notamment dans les espaces interstitiels entre grains de gel), lorsque la gel-filtration est conduite, sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharide et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml. Les fractions les plus actives sont alors contenues dans les 1,5 litres qui passent ensuite.

Le contenu des premiers 2,5 litres est en grande partie formé d'héparane-sulfates ou héparitine-sulfates, produits de poids moléculaires élevés et de forte viscosité, qui n'ont pas d'activité anticoagulante.

Le passage d'une colonne à une autre colonne de même longueur mais de section différente suppose la modification du volume de solution (de même concentration) à placer sur l'autre colonne, vis-à-vis du volume placé sur la précédente colonne, dans un rapport égal au carré de celui des sections (ou diamètres) de ces colonnes, pour que les mêmes fractions soient obtenues dans un volume d'élution de l'autre colonne se trouvant lui aussi dans un rapport avec le volume d'élution correspondant de la précédente colonne sensiblement égal au carré du rapport desdites sections.

Les gel-filtrations de ce type présentent également l'avantage supplémentaire - outre celui qui réside dans l'obtention de fractions dans lesquelles le rapport des titres Yin-Wessler est plus favorable - de fournir des produits dont les solutions ont une viscosité très réduite.

A cet égard, il convient de remarquer aussi, que le procédé selon l'invention d'extraction des fractions mucopolysaccharidiques au moyen d'une solution d'alcool 55-61° GL, de préférence 58°GL, à partir d'une héparine commerciale ou purifiée, notamment de qualité injectable, mais contenant toujours encore des proportions notables d'héparane-sulfates ou des produits analogues à poids moléculaires élevés, constitue en soi aussi un procédé permettant la réduction dans des proportions importantes de la viscosité des solutions aqueuses, qui peuvent ensuite être formées à partir de ces héparines, alors essentiellement exemptes de ces fractions mucopolysaccharidiques.

Cette réduction de viscosité présente un avantage certain, eu égard à l'application ultérieure de telles héparines en thérapeutique anticoagulante, par injection parentérale, notamment sous-cutanée.

A partir des fractions ayant des rapports de titres Yin-Wessler/USP de l'ordre de 6 à 8, il est possible d'obtenir, par des fractionnements supplémentaires, notamment par gel-filtration ou analogue, des fractions mucopolysaccharidiques caractérisées par des rapports de titres Yin-Wessler/USP excédant 10, notamment de l'ordre de 13-16, et ayant des titres Yin-Wessler supérieurs à 130, notamment de 135-160 unités/mg.

Il est entendu que les indications de poids moléculaires qui précèdent (et qui suivent, notamment dans les exemples) découlent des mesures de temps de rétention de solutions ayant une teneur déterminée de matière étudiée, dans des expériences de 5 gel-permération à travers une colonne de gel, dans des conditions d'élution également déterminées, les logarithmes de ces indications de poids moléculaire étant dans la même relation de proportionnalité vis-à-vis des temps de rétention mesurés susdits, que le sont ceux des poids moléculaires de 4.000, 6.500, 16.000 et 31.000 respectivement, de 10 polystyrène - sulfonates de sodium étalons, notamment ceux commercialisés par la société dite CHROMPACK (Orsay-les-Ulis, France), vis-à-vis de leurs temps de rétention respectifs, mesurés dans un système et sous des conditions de gel-permération identiques.

Dans la mesure où les fractions traitées, quel que soit le degré de purification atteint, se trouvent à l'état de sels d'un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium, elles peuvent ensuite être transformées en des sels mixtes ou simples contenant un autre métal physiologiquement acceptable, tel que le calcium, par tout procédé applicable aux sels 15 d'héparine. Avantageusement, on pourra avoir recours au procédé décrit dans le brevet français n° 73 13580 déposé le 13 avril 1973 au nom de la demanderesse. On rappelle que ce procédé consiste essentiellement, partant par exemple d'un sel de sodium d'héparine, à mettre celui-ci en contact avec un sel différent 20 d'un autre métal physiologiquement acceptable, par exemple le chlorure de calcium, au sein d'une solution, à procéder ensuite à la séparation des ions métalliques non liés à l'héparine (par exemple par précipitation alcoolique ou dialyse) et, dans la mesure où le taux de substitution atteint n'est pas suffisant, à 25 remettre en contact, au sein d'une solution, le sel mixte d'héparine obtenu au terme du premier contact, avec une nouvelle dose de l'autre sel, notamment du chlorure de calcium, selon le taux de substitution final désiré.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront 30 encore au cours de la description qui suit d'exemples préférés de mise en oeuvre de l'invention, notamment en rapport avec les dessins dans lesquels :

- la fig. 1 est représentative d'un diagramme d'élution caractéristique d'une fraction mucopolysaccharidique préférée, conforme à l'invention,
- les fig. 2 à 7 font apparaître des propriétés biologiques comparées de fractions mucopolysaccharidiques conformes à l'invention et d'une héparine classique à activité anticoagulante élevée (en titre USP).

EXEMPLE I :

La matière première est constituée par 100 g d'une héparine injectable ayant un titre de 170 UI/mg (unités USP).

10 On ajoute à ces 100 g d'héparine 2.500 ml d'alcool 58°GL. Après une agitation violente pendant 15 minutes, l'agitation forte est maintenue pendant 15 heures. On centrifuge ensuite à 7.000 tours par minute pendant 1 heure et l'on récupère le surnageant : 2.400 ml.

15 On ajoute ensuite à ce surnageant 80 ml de solution saturée de chlorure de sodium, puis 2.400 ml d'alcool 100°GL.

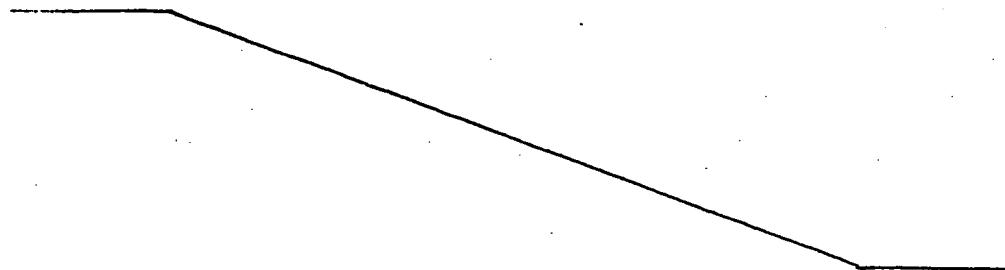
Le produit précipité est récupéré, lavé à l'alcool et séché. Il pèse 2,1 g. Ses caractéristiques sont les suivantes :

- titre USP : 45 UI/mg,
- 20 - titre anti-Xa : 160 UI/mg.

Le rapport anti-Xa/USP est donc de 3,55.

EXEMPLE II :

La matière première utilisée provient de sous-fractions telles qu'elles sont obtenues à l'occasion de la purification d'une 25 héparine du commerce, en vue de la production d'une héparine injectable. Elle provient notamment en partie du surnageant obtenu par addition de 0,6 à 0,7 volume d'alcool 100°GL à une solution aqueuse de l'héparine contenant 10 à 20 g par litre de chlorure de sodium, l'héparine purifiée précipitée étant alors récupérée en vue de 30 purifications. La matière première ici retenue contient également divers résidus de purification de l'héparine, notamment ceux obtenus à l'occasion des précipitations alcooliques, en vue de débar-



rasser l'héparine injectable des traces de sels minéraux.

On ajoute à 10 kg de cette matière première 30 volumes d'alcool 58°GL (300 litres). On soumet la suspension à une dispersion et agitation violentes pendant 15 minutes, l'agitation étant encore maintenue de façon énergique pendant 12 heures. On laisse ensuite reposer pendant 48 heures, afin d'obtenir une décantation de la matière première non solubilisée. Le surnageant légèrement trouble est alors repris et clarifié par centrifugation.

On ajoute au surnageant (volume de 280 litres) 10 litres d'une solution saturée de chlorure de sodium, puis 1 volume (280 litres d'alcool) 100°GL. le précipité obtenu, qui contient la fraction mucopolysaccharidique, est lavé à l'alcool 100°GL, puis séché.

On obtient 660 g d'une fraction dont les titres Yin-Wessler et USP, respectivement, sont déjà dans un rapport supérieur à 2 (fraction P194HH_(A)).

On procède encore à un fractionnement supplémentaire de cette fraction, en dissolvant les 660 g dans 13.200 ml d'eau.

On ajoute à la solution formée 264 g de chlorure de sodium, puis 1,5 volumes d'alcool 100°GL (19,8 litres). Le produit précipité est recueilli, lavé à l'alcool, puis séché. On obtient 640 g de la fraction P194HH_(C) ayant les caractéristiques suivantes :

- titre USP : 31 UI/mg,
- titre Yin-Wessler : 100 UI/mg.

Le surnageant contient également des fractions mucopolysaccharidiques actives (leur récupération est décrite à l'exemple IV).

La fraction P194HH_(C) contient encore une quantité relativement importante de substances de hauts poids moléculaires en majeure partie d'héparitine - sulfates, sans activité anticoagulante, aussi bien dans le test USP que dans le test de Yin-Wessler.

Après redissolution dans un tampon NaCl 0,5 M, tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à raison de 50 mg/ml, on procède à une gel-filtration de volumes de 150 ml de la solution sur AcA44, en colonne de diamètre 215 mm, 35 de hauteur 1 mètre, sous un débit de 800 ml/heure. Les substances de poids moléculaire élevé, dont la majeure partie des héparitine - sulfates passent avec les 10 premiers litres de solution éluée, volume mort non compris.

Une fraction mucopolysaccharidique à titre Yin-Wessler plus élevé , à rapport de titres Yin-Wessler/USP de l'ordre de 4 à 8, peut être obtenue à partir des 6 litres suivants d'éluat.

EXEMPLE III :

Cet exemple décrit une variante de traitement de la fraction P19⁴HH_(C) de l'exemple II. Redissoute dans du tampon NaCl 0,5 M, tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, à raison de 50 mg/ml, elle 5 est soumise à une gel-filtration sur ULTROGEL AcA 44, en colonne de diamètre 10 cm, hauteur 100 cm. Le débit d'élution est de 200 ml/heure.

L'éluat est recueilli en fraction de 50 ml. La teneur en mucopolysaccharides de chaque fraction est évaluée de la 10 manière suivante : à 1 ml de la fraction sont ajoutés 2 ml d'alcool 100°GL. Après 2 minutes de repos, la turbidité du mélange est mesurée à 660 nanomètres, au spectrophotomètre (mesures de densités optiques). Cette turbidité est directement proportionnelle à la teneur en mucopolysaccharides de la solution 15 testée.

On recueille la fraction C10, contenue dans le dernier tiers du quatrième litre d'éluat, volume mort non compris. Le rapport des titres Yin-Wessler/USP de la fraction C10 est de 50/6.

20 EXEMPLE IV :

Le surnageant final de l'exemple II est lui-même additionné de 19,8 litres d'alcool 100°GL et la suspension formée laissée au repos pendant 24 heures.

Le précipité formé est recueilli, lavé à l'alcool 25 100°GL et séché. On obtient 6 g d'une fraction dite P19⁴HH_(P) ayant les caractéristiques suivantes :

- titre USP : 7 UI/mg,
- titre Yin-Wessler : 46 UI/mg.

30 EXEMPLE V :

La fraction P19⁴HH_(P) est à nouveau dissoute dans un tampon de tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 30 g/l, à raison de 50 mg/ml.

La solution est soumise à une gel-filtration sur une 35 colonne d'ULTROGEL AcA 44 (Pharmacia K 100/100, volume : 7 litres; hauteur 100 cm ; diamètre : 10 cm) sous un débit de 200 ml/heure.

Le diagramme d'élution obtenu est schématiquement indiqué à la fig. 1, représentative des variations de la teneur en 40 matière (densité optique D0 mesurée à 660 nanomètres) en fonction

du volume élué, en litres (1).

On recueille, après passage d'un volume de liquide correspondant au volume mort de la colonne, les fractions successives K, J, I, G, F, E, D, C, B et A, dont les volumes sont indiqués par 5 les longueurs des segments d'abscisse correspondants de la fig. 1.

Chacune de ces fractions possède les caractéristiques analytiques qui figurent dans le tableau ci-après.

10 TABLEAU I
Caractéristiques des fractions obtenues

	N° fraction	Poids (mg)	Titre USP (UI)	Titre anti-Xa (UI)	Rapport anti-Xa / USP
15	A	120	3,7	44,4	12
	B	120	4,5	72	16
	C	250	6	54	9
20	D	150	9	135	15
	E	300	9	144	16
	F	400	11	143	13
25	G	300	11,5	161	14
	H	200	13	143	11
	I	50	13	91	7
30	J	200	7	14	2
	K	3500	0	0	/

On constate que les fractions peuvent être groupées en quatre types :

a) Les fractions A, B, C, dont les volumes d'élution correspondant, dans le protocole opératoire sus-décris, essentiellement au quatrième litre élué, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler inférieurs à 80 ; leurs poids moléculaires sont au plus de l'ordre de 4.000 ;

b) Les fractions D, E, F, G, H, dont les titres USP sont inférieurs à 10 et les titres Yin-Wessler très élevés : 135 à 161 unités ; ces fractions présentent aussi les rapports de titres Yin-Wessler/USP les plus favorables, de 13 à 16 ; elles 5 sont essentiellement contenues dans le troisième litre d'éluat ; leurs poids moléculaires sont de l'ordre de 4.000 à 10.000, notamment de 4.000 à 8.000 ;

c) Les fractions I et J, dont les rapports de titres Yin-Wessler/USP tendent à devenir défavorables, et qui sont probablement déjà contaminées par la fraction K ci-après et 10

d) la fraction K, contenant encore essentiellement des héparane - sulfates dépourvus d'activité anticoagulante ..

On a rapporté dans le tableau II les poids moléculaires de certaines des fractions estimées d'après les temps de rétention mesurés en gel-perméation, par référence à ceux des susdits polystyrène-sulfonates de poids moléculaires connus. La fraction F se caractérise par un pic principal correspondant à un temps de rétention de 6,6 minutes et par un épaulement correspondant à un temps de rétention de 6,1 minutes, qui témoigne de la présence 20 d'un constituant dont le poids moléculaire se situe vers 7.200 dans le système de référence considéré.

Les mesures ont été faites par gel-perméation (à l'aide d'un chromatographe SPECTRAPHYSICS 3500), sur des colonnes (250 x 9 mm) garnies de silice de granulométrie 10-100 microns, 25 notamment celles commercialisées sous la désignation LICHROPHOS-PHER, de solutions de ces fractions dans un tampon Na_2SO_4 0,02 M, à raison de 1,3 mg de matière mucopolysaccharidique/ml (volume initialement déposé sur la colonne : 50 μl) et sous un débit d'élution de 3 ml/minute. La détection des matières a été faite 30 par spectrophotométrie UV (200 μm).

Des fractions mucopolysaccharidiques conformes à l'invention sont donc encore celles qui, dans un système de gel-perméation sur des colonnes garnies de silice à granulométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de 9 mm de diamètre, 35 sont caractérisées par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notamment de 6,6 à 7,0 minutes dans une telle colonne, lorsque 50 μl d'une solution de 1,3 mg/ml de ces fractions dans un tampon Na_2SO_4 0,02 M, ayant été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à l'élution desdites fractions sous un débit de 40 3 ml/minute.

TABLEAU II

	PRODUIT	Temps de rétention (minutes)	Poids moléculaires relatifs aux polystyrènes
5	P194HHP (A)	7,0	2.600
	P194HHP (B)	6,9	2.900
	P194HHP (C)	6,8	3.300
	P194HHP (F)	6,6	4.100
	"	6,1*	7.200*
10	polystyrène- sulfonate (1)	6,6	4.000
	" (2)	6,2	6.500
	" (3)	5,4	16.000
	" (4)	4,7	31.000

*épaulement

20 L'invention permet donc d'obtenir des fractions muco-polysaccharidiques à haute activité anti-Xa et présentant à l'égard du facteur Xa une sélectivité remarquable dans le cadre des réactions enzymatiques successives qui caractérisent les processus de coagulation.

25 Cette activité et cette sélectivité remarquables sont encore illustrées par les résultats des essais pharmacologiques exposés ci-après, lesquels ont été réalisés avec la fraction P188CH, obtenue après transformation de la fraction P194HHC de l'exemple II, encore sous forme de sel de sodium, en la forme de sel de calcium, par le procédé rappelé plus haut.

30 Ces résultats sont illustrés par les courbes des fig. 2 à 7, lesquelles visent toutes à faire apparaître les effets anticoagulants comparés de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention, d'une part, et d'une héparine classique (170 unités USP/mg), d'autre part.

35 Les courbes des fig. 2 à 5 correspondent à l'étude de la variation observée *in vitro* des temps de coagulation induits dans des plasmas sanguins humains par des doses croissantes d'une héparine classique, d'une part, et de la fraction P188CH, d'autre part (les essais correspondant aux fig. 4 et 5 ayant été réalisés sur des plasmas exempts de plaquettes et par conséquent appauvris en facteur XI).

2440376

Les fig. 6 et 7 concernent des résultats comparés obtenus *in vivo* chez le lapin, avec la même fraction P188CH (fig. 6) et l'héparine de référence (fig. 7) (moyenne des résultats obtenus sur des groupes de 5 lapins). Chacun des lapins avait reçu 500 unités 5 Yin-Wessler par kg de la composition à tester.

Concernant tout d'abord les fig. 2 à 5, elles font apparaître les variations des temps (en secondes) :

- de thrombine (fig. 2),
- de céphaline-kaolin (fig. 3),
- 10 - de coagulation en présence de thromboplastine concentrée (fig. 4) et de thromboplastine diluée (fig. 5), respectivement induites par les préparations étudiées, à savoir la fraction mucopolysaccharidique (courbes a_1 , a_2 , a_3 et a_4) et l'héparine de référence (courbes b_1 , b_2 , b_3 et b_4) en fonction des 15 doses utilisées respectives, toutes exprimées en unités USP/ml.

Les temps de thrombine et les temps de céphaline-kaolin constituent tous deux des types de mesure reflétant plutôt l'action des préparations étudiées sur respectivement l'inhibition du facteur II activé et la coagulation globale. Les courbes des fig. 2 et 20 3 font à cet égard apparaître clairement que la fraction mucopolysaccharidique selon l'invention exerce un effet nettement plus réduit que celui de l'héparine de comparaison sur l'inhibition de l'activation de la prothrombine et au niveau de la coagulation globale. Par contre, les fig. 4 et 5, qui sont représentatives de 25 phénomènes plus directement liés à la séquence des réactions enzymatiques, caractéristiques de la coagulation extrinsèque (notamment en la relative absence du facteur IIa), font apparaître un net avantage de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention vis-à-vis de l'héparine de référence. La première entraîne en 30 effet dans ces conditions une coagulation plus retardée de l'échantillon sanguin.

Dans la fig. 6, on a représenté les variations des activités mesurées chez le lapin ayant reçu 500 unités Yin-Wessler de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention, en fonction du temps, 35 exprimé en heures. Pour l'appréciation de ces activités, on a eu recours à la variation des titres Yin-Wessler (courbe YW_5) et des titres en temps de céphaline-kaolin (courbe TCK_5) (UI/ml de plasma).

Les mêmes mesures ont été effectuées avec l'héparine de référence. Les variations correspondantes des activités étudiées sont illustrées par les courbes YW_6 et TCK_6 de la fig. 7.

Si l'on examine la fig. 6, on constate que l'administration de 40 500 unités Yin-Wessler du mucopolysaccharide selon l'invention provoque une activité anti-Xa importante, comparée

à l'effet de coagulabilité globale, exprimée en unités TCK, qui reste relativement faible. On note par exemple qu'à la deuxième heure, l'activité Yin-Wessler est de 0,85 UI/ml, alors que l'activité TCK n'est que de 0,15 UI/ml. Par contre, 500 unités Yin-Wessler/ml de l'héparine de référence induisent une action exprimée par les titres TCK, nettement plus importante relativement à l'activité anti-Xa mesurable par le titre Yin-Wessler. En particulier, on note qu'à la deuxième heure, l'activité anti-Xa correspond à 0,55 UI/ml, et que l'activité anticoagulante globale, TCK, n'est plus que de 0,38 UI/ml. L'écart entre les deux titres est donc beaucoup moins important que dans le cas du mucopolysaccharide selon l'invention. Le rapport du titre Yin-Wessler au titre TCK passe donc d'une valeur inférieure à 2 pour l'héparine de référence à une valeur supérieure à 5 pour la fraction mucopolysaccharide de l'invention.

Les essais *in vitro* et *in vivo* sont donc tous deux dans le sens d'une action de la fraction mucopolysaccharidique de l'invention nettement plus sélective, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa, que celle de l'héparine de référence.

Les fractions mucopolysaccharidiques selon l'invention sont atoxiques. L'administration de 10.000 UI/kg (titre Yin-Wessler), soit de 100 mg/kg de P188CH, n'entraîne chez le lapin aucune réaction toxique et aucun effet pyrogène dans le test de pyrogénicité sur le lapin conforme à la Pharmacopée française.

L'invention concerne donc plus particulièrement des fractions mucopolysaccharidiques du type qui vient d'être décrit, ayant notamment une activité d'au moins 40, de préférence au moins 50, et même de façon plus avantageuse encore d'au moins 100 UI/mg (titre Yin-Wessler). Elle concerne également les préparations pharmaceutiques, ayant des activités semblables, exemptes de substances pyrogènes, et en association avec des excipients pharmaceutiques. Elle concerne en particulier des solutions concentrées de ces fractions, injectables, stériles, utilisables en thérapeutique pour le contrôle de la coagulation sanguine, solutions contenant de 1.000 à 100.000 UI (Yin-Wessler)/ml de la fraction mucopolysaccharidique, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 UI/ml, lorsque ces solutions sont destinées à l'injection sous-cutanée ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple 5.000 unités UI/ml de la fraction mucopolysaccharidique, lorsqu'elles sont destinées à l'injection intraveineuse ou à la perfusion.

La fraction mucopolysaccharidique selon l'invention

2440376

est avantageusement sous forme de sel d'au moins un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium et/ou le calcium. Avantageusement, ces proportions pharmaceutiques sont présentées sous forme de seringues à n'utiliser qu'une fois, prêtes à l'emploi au moment approprié.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées au contrôle (préventif ou curatif) de la coagulation sanguine chez l'homme ou l'animal, notamment dans ceux des cas où l'hôte est soumis à des risques d'hypercoagulabilité, plus particulièrement ceux résultant d'une perturbation de la phase extrinsèque susdite, par exemple comme conséquence d'une libération par l'organisme de thromboplastine, par exemple de thromboplastine tissulaire (interventions chirurgicales, processus athéromateux, développement de tumeurs, perturbations des mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc.). Dans le seul but d'illustrer l'invention, et sans que l'on puisse y trouver de cause à limiter la protection de l'invention, on indiquera ci-après, à titre d'exemple, une posologie susceptible d'être utilisée chez l'homme : elle comprend par exemple l'administration au patient de 1.000 à 25.000 UI par voie sous-cutanée, deux à trois fois par jour, selon le niveau des risques d'hypercoagulation ou l'état thrombotique du patient, ou de 1.000 à 25.000 UI par 24 heures par voie intraveineuse, en administration discontinue à intervalles réguliers ou de façon continue par perfusion, ou encore de 1.000 à 25.000 UI (trois fois par semaine) par voie intramusculaire (titres exprimés en UI Yin-Wessler). Les doses devront naturellement, chez chaque patient, être ajustées selon les résultats des analyses sanguines préalablement effectuées, de la nature de l'affection dont le patient souffre et, d'une façon générale, de son état de santé, comme cela est bien connu.

L'invention concerne également encore l'application des mucopolysaccharides selon l'invention à la constitution de réactifs biologiques utilisables au laboratoire, notamment à titre de référence de comparaison pour l'étude d'autres produits dont est testée l'activité anticoagulante, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes, en particulier celles dans lesquelles le milieu hydroalcoolique d'extraction sus-défini est formé par un mélange d'eau

2440376

et d'un alcool autre que l'éthanol, par exemple un alcool aliphatic ou aromatique, de préférence un alcool aliphatic saturé, cyclique ou acyclique, tel que des alcools primaires comportant de 1 à 6 atomes de carbone, étant naturellement entendu qu'il convient 5 dans chaque cas de déterminer, par de simples opérations de routine, les proportions eau/alcool du milieu qui conduisent à une extraction d'une fraction mucopolysaccharidique équivalente à celle qui est obtenue avec un mélange eau-éthanol 55-61°GL.

REVENDICATIONS

1 - Fraction mucopolysaccharidique susceptible d'être obtenue à partir de l'héparine ou de fractions comportant des constituants hépariniques de poids moléculaires de 2.000 à 50.000, tels qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par extraction à partir
5 de tissus de mammifères, cette fraction étant caractérisée en ce qu'elle est soluble dans un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol) ayant un titre de 55-61°GL, en ce qu'elle tend à l'insolubilité dans un milieu eau-éthanol ayant une teneur en alcool plus élevée, en ce qu'elle est insoluble dans l'alcool pur, et en ce qu'elle
10 présente un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont respectivement dans un rapport au moins égal à 2, notamment d'au moins 3, de préférence supérieur à 6.

2 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le rapport de son titre Yin-Wessler à son
15 titre USP est supérieur à 10, voire même à 16.

3 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement formée de constituants dont les poids moléculaires sont inférieurs à 10.000.

20 4 - Fraction mucopolysaccharidique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement formée de constituants dont les poids moléculaires sont compris entre environ 2.000 et environ 8.000.

5 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 4, caractérisée en ce que dans une opération de gel-filtration sur colonne de gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, du type commercialisé sous la désignation ULTROGEL AcA 44, elle passe après élution d'un volume de 2,5 litres, volume mort non compris, lorsque la gel-filtration est conduite,
30 sous un débit de 200 ml/heure, dans une colonne ayant un diamètre de 100 mm et une hauteur de 1 m et lorsque la concentration en mucopolysaccharide et le volume de la solution placée sur la colonne ont été respectivement de 50 mg/ml et 37,5 ml, l'essentiel de cette fraction étant notamment contenu dans les 1,5 litres d'éluat qui passent ensuite.

35 6 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée par celle qui, dans un système de gel-perméation sur des colonnes garnies de silice à gra-

2440376

nulométrie de 10-100 microns, de 250 mm de hauteur et de 9 mm de diamètre, est caractérisée par un temps de rétention de l'ordre de 5,7 à 7,5, notamment de 6,6 à 7,0 minutes dans une telle colonne, lorsque 50 µl d'une solution de 1,3 mg/ml de cette fraction dans un tampon Na₂SO₄ 0,02 M, ayant été placés sur cette colonne, l'on procède ensuite à l'éluion de ladite fraction sous un débit de 3 ml/minute.

7 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée par des rapports de titres Yin-Wessler/USP excédant 10, notamment de l'ordre de 13-16, et ayant des titres Yin-Wessler supérieurs à 130, notamment de 135-160 unités/mg.

8 - Fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ses constituants sont à l'état de sels d'au moins un métal physiologiquement acceptable, tel que le sodium ou le calcium.

9 - Procédé d'obtention d'une fraction mucopolysaccharidique ayant des titres Yin-Wessler et USP dans un rapport supérieur à 2, notamment à 3, caractérisé par :

- la mise en suspension dans un milieu hydro-alcoolique du type eau-éthanol, ayant un titre compris entre environ 55 et environ 61°GL, de préférence de l'ordre de 58° GL, d'une matière à base d'héparine ou de constituants hépariniques dont les poids moléculaires s'étagent notamment de 2.000 à 50.000, cette matière ayant une teneur réduite en sels minéraux, de préférence inférieure à 1 % en poids,

- la séparation de la fraction insoluble et la récupération de la solution contenant la fraction mucopolysaccharidique dissoute, dont elle peut à son tour être séparée, notamment par précipitation alcoolique, à partir du susdit milieu hydro-alcoolique.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé par une étape de fractionnement supplémentaire de la fraction mucopolysaccharidique préalablement récupérée à partir du susdit milieu hydro-alcoolique et remise en solution dans l'eau, étape qui consiste à ajouter à cette solution aqueuse de 1 à 2 volumes d'éthanol et de 10 à 100 g/l de chlorure de sodium et à recueillir, d'une part, le précipité formé également actif et, d'autre part, le contenu restant dissous dans le surnageant, notamment par une nouvelle précipitation alcoolique, et qui constitue un produit de fractionnement dont les titres Yin-Wessler et USP respectivement sont dans un rapport encore plus élevé que celui relatif à la fraction initiale, notamment passent d'une valeur de l'ordre de 3 à une valeur de l'ordre de 6 à 8.

11 - Procédé selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que la fraction mucopolysaccharidique obtenue est soumise à une gel-filtration, notamment sur gel de polyacrylamide et d'agarose, sous forme de perles, connu sous la désignation commerciale 5 ULTROGEL AcA 44, dont la zone de fractionnement effectif se situe entre des poids moléculaires effectifs de 4.000 à 60.000 (pour les molécules linéaires).

12 - Fraction mucopolysaccharidique présentant les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de celle obtenue par 10 la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11.

13 - Composition pharmaceutique, notamment pour le contrôle de la coagulation, dont le principe actif est constitué par la fraction mucopolysaccharidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 12.

14 - Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une solution concentrée de cette fraction, injectable, stérile, utilisable en thérapeutique, pour le contrôle de la coagulation sanguine, solution contenant de 20 1.000 à 100.000 UI (Yin-Wessler)/ml de la fraction mucopolysaccharidique, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 UI/ml, lorsque ces solutions sont destinées à l'injection sous-cutanée, ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple 5.000 unités UI/ml de la fraction mucopolysaccharidique, 25 lorsqu'elle est destinée à l'injection intraveineuse ou à la perfusion.

15 - Réactif biologique constitué par la fraction mucopolysaccharidique de l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 12.

Pl. I-4

2440376

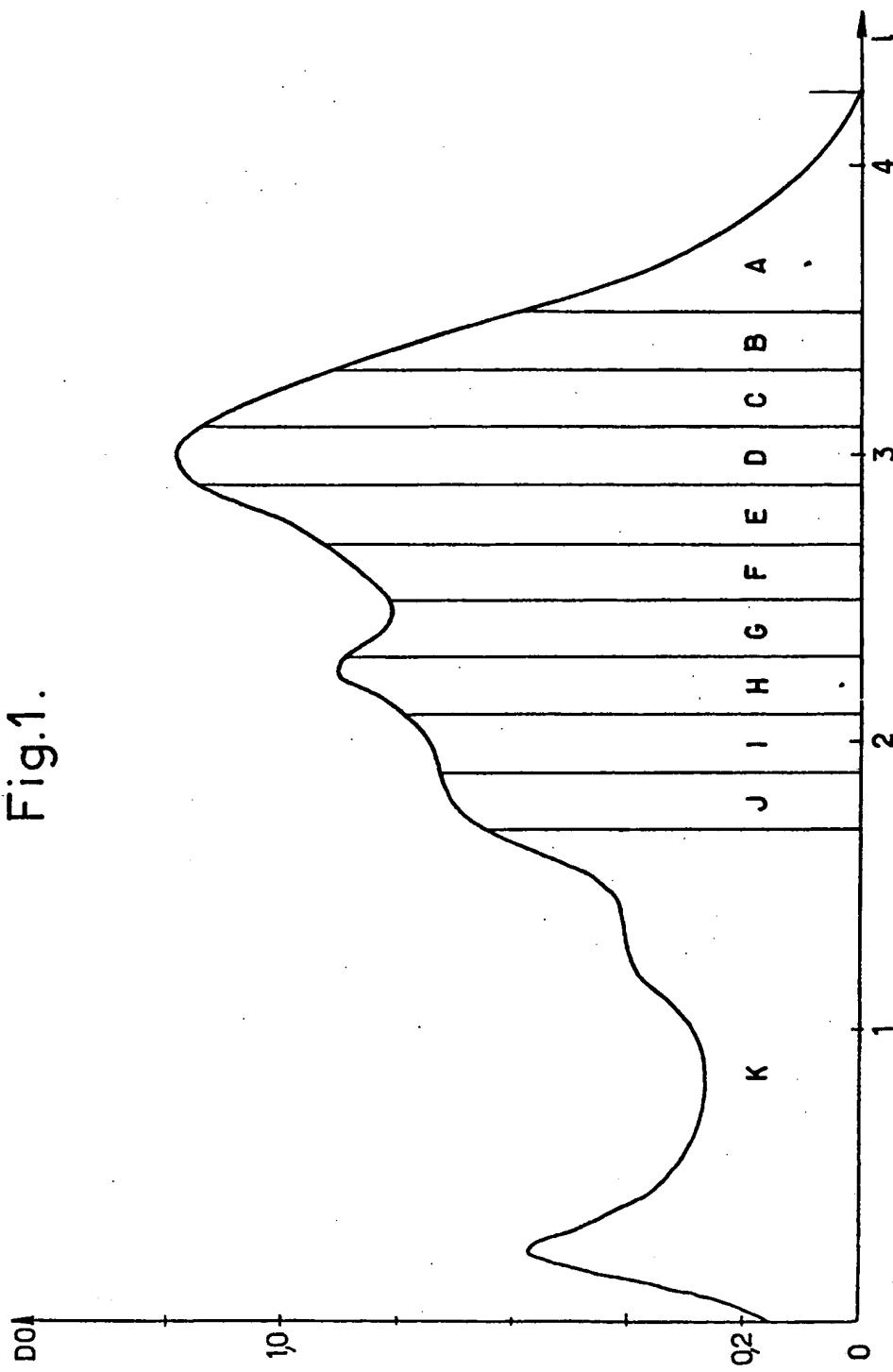


Fig.1.

Pl. II-4

2440376

Fig. 3.

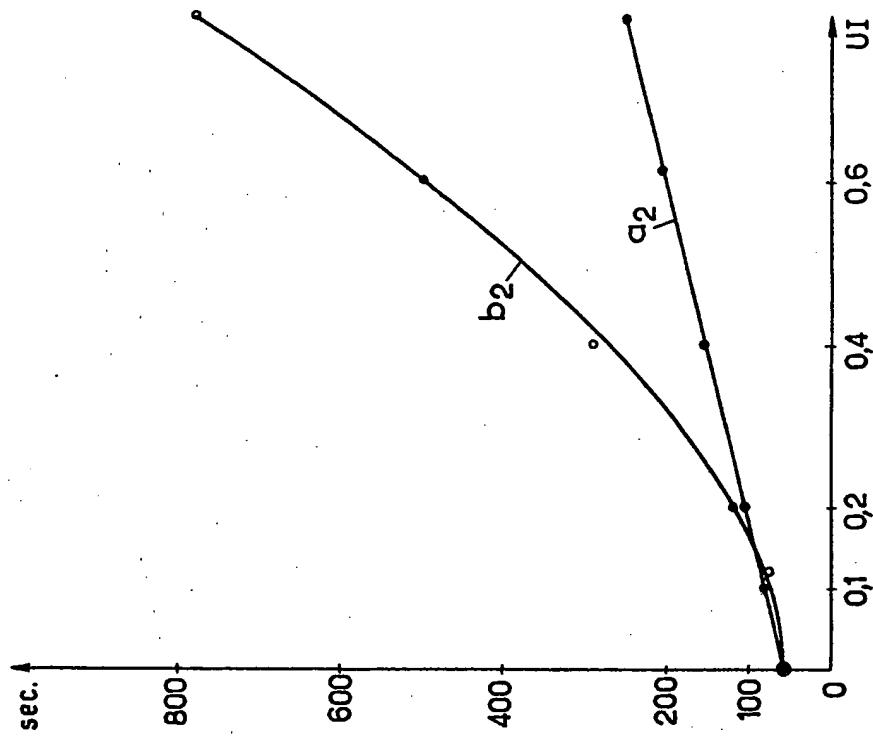


Fig. 2.

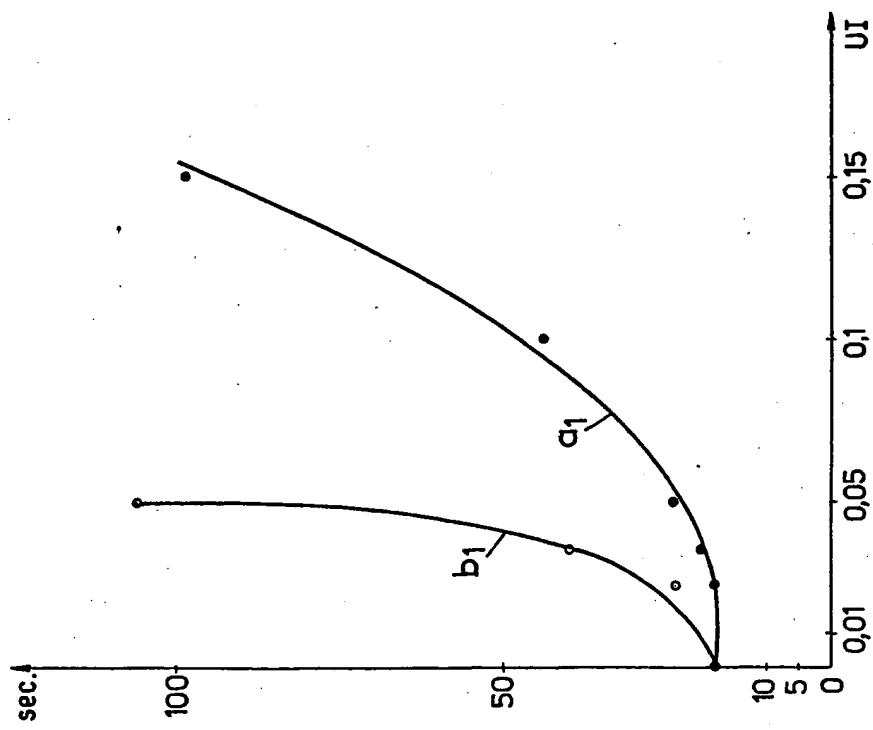


Fig. 4.

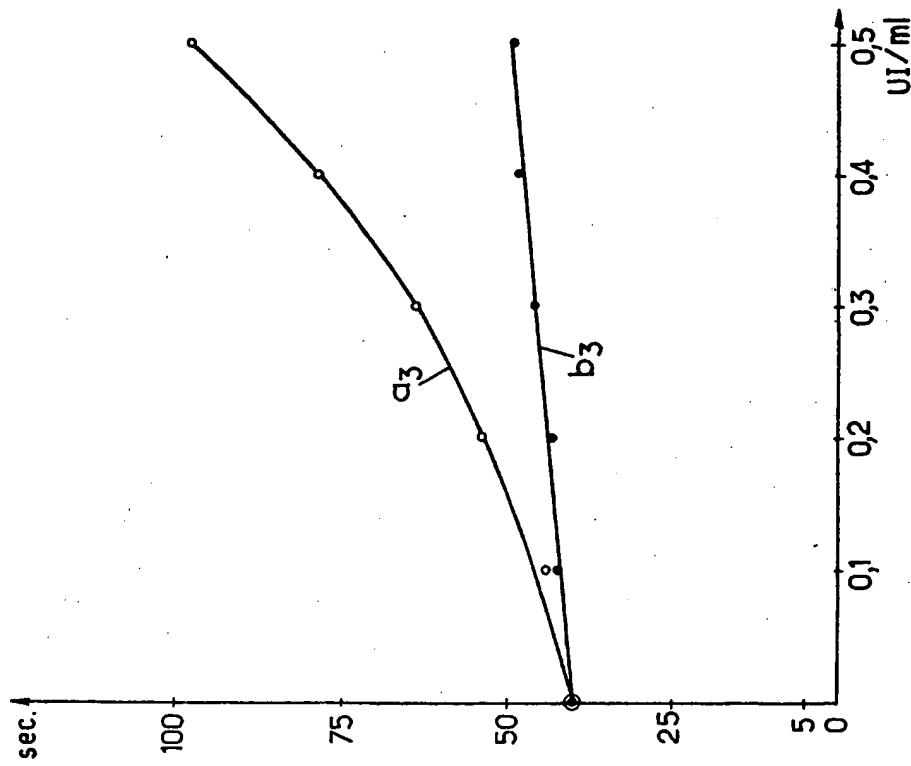


Fig. 5.

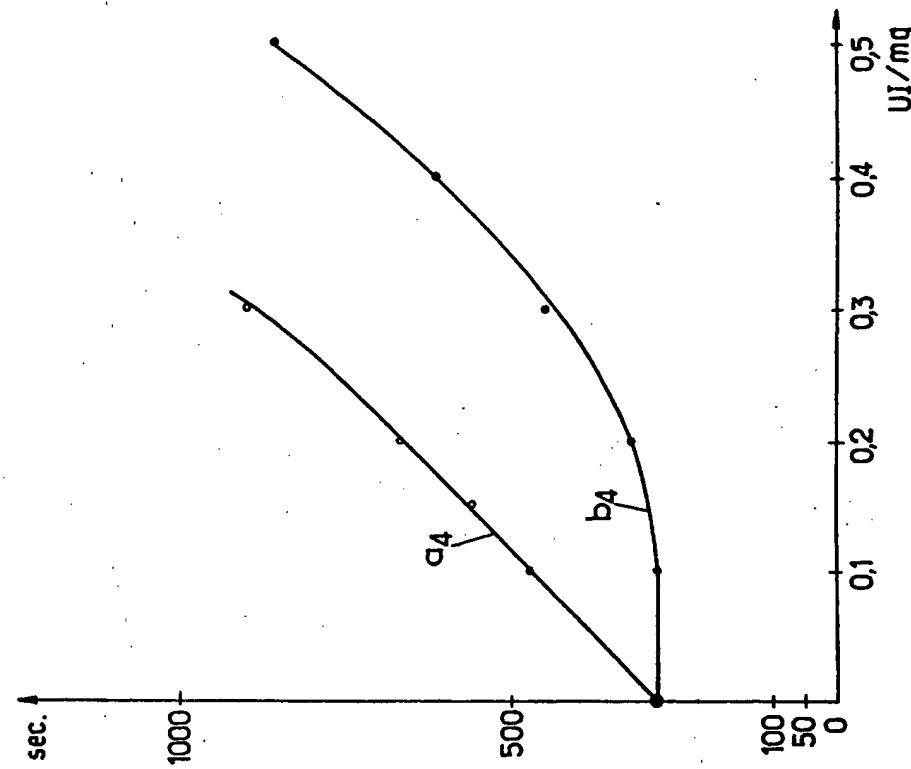


Fig. 6.

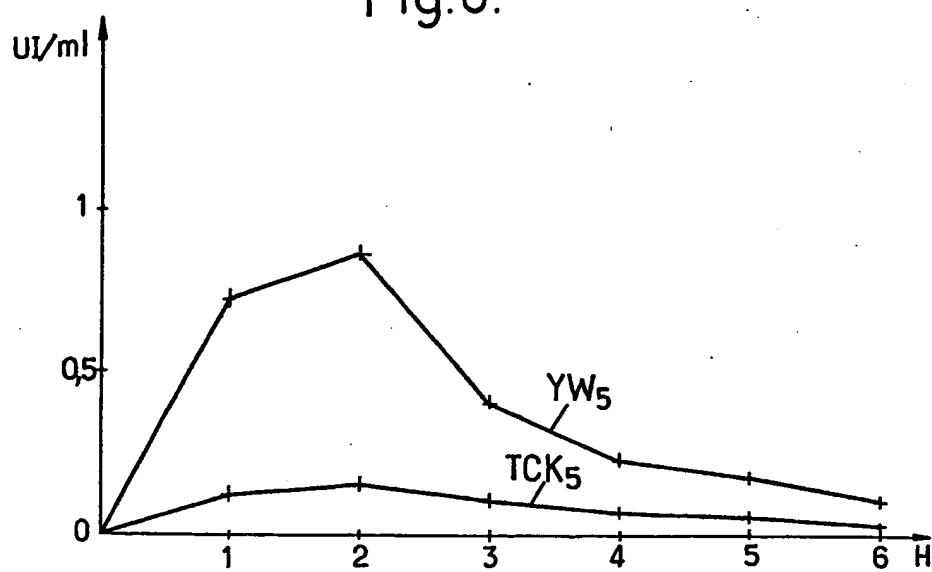


Fig. 7.

